chinaXiv:202307.00039v1

大型河流中 eDNA 监测结果的小尺度时空差异及重复采样建议*

杨海乐 [1]，许兰馨 [1,2]，吴金明 [1]，杜　浩 [1]**

（1.中国水产科学研究院长江水产研究所，农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室，湖北　武汉 430223

2.南京农业大学无锡渔业学院，江苏　无锡　214000）

摘　要：样品重复数设计是 eDNA 监测技术标准化中最靠前的一个关键环节，采样中应该设置多少个样品重复先前已有研究探讨，而样品重复应该是在空间上设置系列样点，还是在时间上设置连续采样，这对于 eDNA 监测实践十分重要，但尚未有研究仔细探讨。针对此问题，本研究以长江武汉段为案例，通过分析不同重复采样方式所获得的 eDNA 监测检出的物种组成，探讨大型河流中 eDNA 监测的重复采样建议。结果显示，细菌和后生动物的 eDNA 监测空间序列样品比时间序列样品所检出的累计物种数多，所检出物种组成的空间异质性比时间异质性大，而真菌、藻类、原生动物三个细分类群相反。因此，我们建议在大型河流中，用 eDNA 监测环境微生物和后生动物，样品重复的设计优先关注空间重复采样；监测真菌、藻类、原生动物，样品重复的设计优先关注时间重复采样。采取空间重复采样应注意采样时间的选择，采取时间重复采样应注意采样点位的选择，针对细分类群的监测采样应注意保证样品重复数量。

关键词：eDNA 监测；小尺度时空差异；重复采样；16S rRNA 基因；*COI* 基因；长江

The small-scale temporal and spatial heterogeneity of eDNA monitoring and suggestions for duplicated eDNA sampling in large river

Yang Haile [1], Xu Lanxin [1,2], Wu Jinming [1] & Du Hao [1]**

(1. *Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan* 430223, *P.R.China*

2. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi* 214000, *P.R.China*)

Abstract: Design of duplicated samples is the first key step for standardizing the processes of eDNA monitoring. Previous works have studied how many duplicated samples should be sampled. However, whether the duplicated samples should be sampled in a series of sites in space or in continuous moments in time has not been carefully discussed, although this question is very important for eDNA monitoring practice. To solve this problem, the current work took a case study in Wuhan section of Yangtze River, got 16 eDNA samples from June 27 to July 14, 2022 day by day (temporal group samples) and 16 eDNA samples across the transection of Yangtze River in June 28 and July 12, 2022 (spatial group samples), and then analyzed the detected species in these eDNA samples to identify the temporal and spatial heterogeneity of eDNA monitoring, so as to provide suitable suggestions for setting duplicated samples in eDNA monitoring practice in large river. The results showed that, for bacteria and metazoa, the total number of species detected in spatial group eDNA samples was more than that detected in

[*] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（YFI202201）、农业农村部财政专项“长江禁捕后常态化监测”资助。

temporal group eDNA samples, and the spatial heterogeneity of species detected in eDNA monitoring was greater than the temporal heterogeneity of which. While for the three taxonomies of fungi, algae and protozoa, there was an opposite status. Therefore, we suggest that to monitor environmental microorganisms and aquatic metazoa in large rivers, spatial duplicated sampling of eDNA monitoring should be given priority in duplicated samples design. To monitoring fungi, algae, protozoa, temporal duplicated sampling of eDNA monitoring should be given priority in duplicated samples design. At the same time, attention should be paid to the selection of sampling time when taking spatial duplicated sampling, and the selection of sampling point when taking temporal duplicated sampling. Moreover, maybe, more duplicated samples are needed when one focuses on the monitoring of a subdivision taxonomy.
Keywords: environmental DNA monitoring; small-scale temporal and spatial heterogeneity; duplicated sampling; 16S rRNA gene; *COI* gene; Yangtze River

chinaXiv:202307.00039v1

eDNA 监测通过从环境样品（水体、土壤、沉积物、空气、混合物等）中提取 DNA 混合物，用物种特异性引物或特定 DNA meta-barcoding 引物对其进行扩增测序、分类学分析、相对丰度分析、功能预测等，来监测环境中是否存在某特定物种，或者获得环境样品中物种组成、群落结构、生态功能等相关信息[1-4]，在国际国内学界都已得到广泛探索性应用关注和参与[5-8]，具有广阔的应用前景[7, 9]。为了推动 eDNA 监测结果的可信度，当前主要任务是推进其技术标准化[10-14]，主要包括样品重复数设计、采样时间设计、采样点设计、采样方法设计、样品前处理、样品保存、扩增引物选择、DNA 提取扩增测序分析程序、序列比对注释、监测结果后评估[4]。

样品重复数设计是 eDNA 监测技术标准化中最靠前的一个关键环节[4]。一方面，eDNA 监测样品重复数越多，所检出信息种类数也越多（同时，检出的信息相对丰度结构也越稳定），这种增加和传统物种调查类似[15, 16]，遵循物种积累曲线的对数增长规则[4, 16]；另一方面，eDNA 监测样品重复数所对应的检出信息种类数增长也受采样库内 eDNA 所包含的信息种类的小尺度时空差异影响，小尺度时空差异越大，所需要的样品重复数越大。在样品重复数有限的现实约束下，如果空间差异比时间差异大，样品采集宜重点关注空间重复；如果时间差异比空间差异大，样品采集宜重点关注时间重复。那么，在常规 eDNA 监测的采样实践中究竟是应该关注空间重复，还是关注时间重复，尚未有相关研究仔细探讨。

本研究以长江干流武汉段为研究区域，针对横跨长江的 eDNA 信息空间差异、针对连续半个月的 eDNA 信息时间差异，开展 eDNA 监测实验，分析的生物信息对象类群包括细菌（16S rRNA 基因检出与指征）、真核生物（线粒体 *COI* 基因检出与指征）及其特定细分类群，量化比较其时间差异特征与空间差异特征，为大型河流开展相应类群 eDNA 监测重复采样设计提供参考。

1 研究区域与方法

2022 年 6 月 27—7 月 14 日期间，在武汉渔政码头附近开展了 16 d 的 eDNA 监测，并在其中 2 天各开展了一次横跨长江左右岸的断面监测（断面上近似平均地设置 8 个采样点）（图 1，表 1）。监测期间，水温在 26.6~29.6 ℃间(趋势性升温)，参考水文站汉口站的监测水位在 22.96~24.65 m 之间(趋势性下降)，监测流量在 32800~40200 m^3/s 之间（趋势性下降）（表 1）。

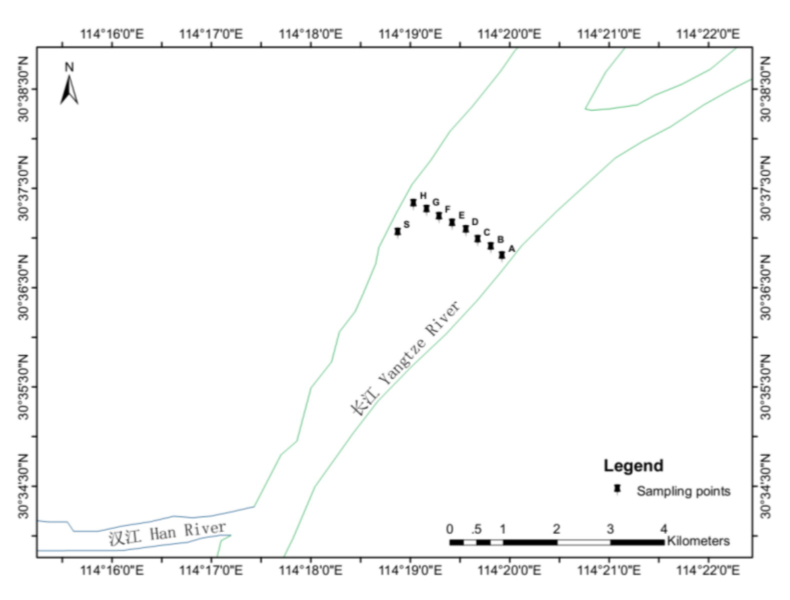


图 1 eDNA 监测采样点示意图

Figure 1 Sampling sites of eDNA monitoring

S 为 14 次日常采样的采样点；A/B/C/D/E/F/G/H 为 2 次断面采样的采样点

表 1 eDNA 样品采集状况及相应水文状况

Table 1 Details for eDNA monitoring and corresponding hydrological conditions

时间	eDNA 样品编号	水温/℃	水位/m	流量/m³/s
2022.6.27	WHW01	26.6	24.63	40100
2022.6.28	WHW02(A/B/C/D/E/F/G/H)	26.8	24.65	40200
2022.6.29	WHW03	26.6	24.61	37900
2022.6.30	WHW04	27.1	24.50	37400
2022.7.1	WHW05	27.1	24.43	37100
2022.7.2	WHW06	27.1	24.34	36800
2022.7.4	WHW07	27.1	24.04	36700
2022.7.5	WHW08	27.4	24.00	36500
2022.7.6	WHW09	27.3	24.15	37200
2022.7.7	WHW10	27.6	24.28	37800
2022.7.8	WHW11	27.6	24.37	38200
2022.7.9	WHW12	27.9	24.27	37700
2022.7.10	WHW13	28.3	24.12	37000
2022.7.12	WHW14(A/B/C/D/E/F/G/H)	29.3	23.54	34800
2022.7.13	WHW15	29.4	23.29	34000
2022.7.14	WHW16	29.6	22.96	32800

注：2 次断面采样，8 个样点(A/B/C/D/E/F/G/H)近似平均地设置，H 点为靠近渔政码头侧的样点，和其它逐日 eDNA 监测样点相近。

chinaXiv:202307.00039v1

用无菌采样瓶采集上层水（离水面 30~50 cm）水样 1.5 L。在正式采集水样并封装之前，用所要采的水涮洗 3 次。水样在冰浴中暂存，在实验室中用 0.2 μm 孔径滤膜进行抽滤（采样后 1~6 h 内处理完毕），获得存留了 eDNA 的滤膜，放入 50 mL 无菌离心管，自封袋装好，–80℃冰箱保存，泡沫箱干冰浴运输。委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 eDNA 提取、线粒体 *COI* 基因的宏条形码（引物 mlCOIintF/ jgHCO2198R）和 16S rRNA 基因的宏条形码（引物 338F/806R）PCR 扩增测序、在美吉生物云平台(www.majorbio.com)上进行序列数据分析获得物种水平的检出。线粒体 *COI* 基因序列结果用 0.99 的 OTU 聚类相似度，0.9 的 nt 库物种注释分类置信度；16S rRNA 基因序列结果用 0.97 的 OTU 聚类相似度，0.7 的 silva138.1/16s_bacteria 库物种注释分类置信度。统计各样品所检出的物种组成, 分组分析时间序列样品监测到的累计物种数、空间序列样品监测到的累计物种数, 用 EstimateS (Version 9.1.0, Copyright R. K. Colwell: http://purl.oclc.org/estimates)计算监测结果的物种积累曲线，用累计检出的物种数除以样均检出的物种数指示样品间物种组成的异质性。

2 结果

2.1 eDNA 监测结果概况

基于线粒体 *COI* 基因的宏条形码（引物 mlCOIintF/ jgHCO2198R）的测序、分析、注释，共检出真核生物（Eukaryota）4 界、28 门、66 纲、137 目、208 科、304 属、513 种，其中真菌 162 种、藻类 123 种、原生动物 27 种、后生动物 201 种(附表 1)。后生动物中有轮形动物(Rotifera)48 种、海绵动物(Porifera) 4 种、刺胞动物（Cnidaria）1 种、扁形动物（Platyhelminthes）2 种、线虫（Nematoda）4 种、腹毛动物(Gastrotricha)2 种、环节动物(Annelida)29 种、节肢动物(Arthropoda)54 种、软体动物(Mollusca) 7 种、硬骨鱼(Actinopteri)37 种、两栖动物(Amphibia)1 种、鸟类(Aves)5 种、哺乳动物(Mammalia) 6 种，以及一批未获得明确注释的无脊椎动物(附表 1)。基于 16S rRNA 基因的宏条形码(引物 338F/806R)的测序、分析、注释，共检出细菌（Bacteria）57 门、174 纲、399 目、661 科、1357 属、1539 种，以及 1280 个未培养和未分类种（附表 2）。

2.2 eDNA 监测结果时空差异

对 eDNA 监测检出结果在三个层面、两个组别的分析结果显示，eDNA 监测检出结果存在一定的时间异质性、空间异质性，物种数逐日逐样累计曲线和统计估算的物种积累曲线呈连续上升趋势，在样品数相同的条件下，空间重复采样比时间重复采样会检出更多的物种，但差距不大并且存在细分类群的差异性（图 2~图 4）。

原核生物(细菌)的物种检出数量在时间上有微弱的下降趋势，在空间上有近岸多、河中间少的趋势，物种组成的时间异质性（2.37）比空间异质性（2.61）略弱，累计物种检出数量时间重复采样的（2461）比空间重复采样的(2543)略少；真核生物的物种检出数量在时间上、空间上均呈随机波动、无明显趋势，物种组成的时间异质性（3.58）比空间异质性（3.40）略强，累计物种检出数量时间重复采样的（409）比空间重复采样的（415）略少（图 2，表 2）。

chinaXiv:202307.00039v1

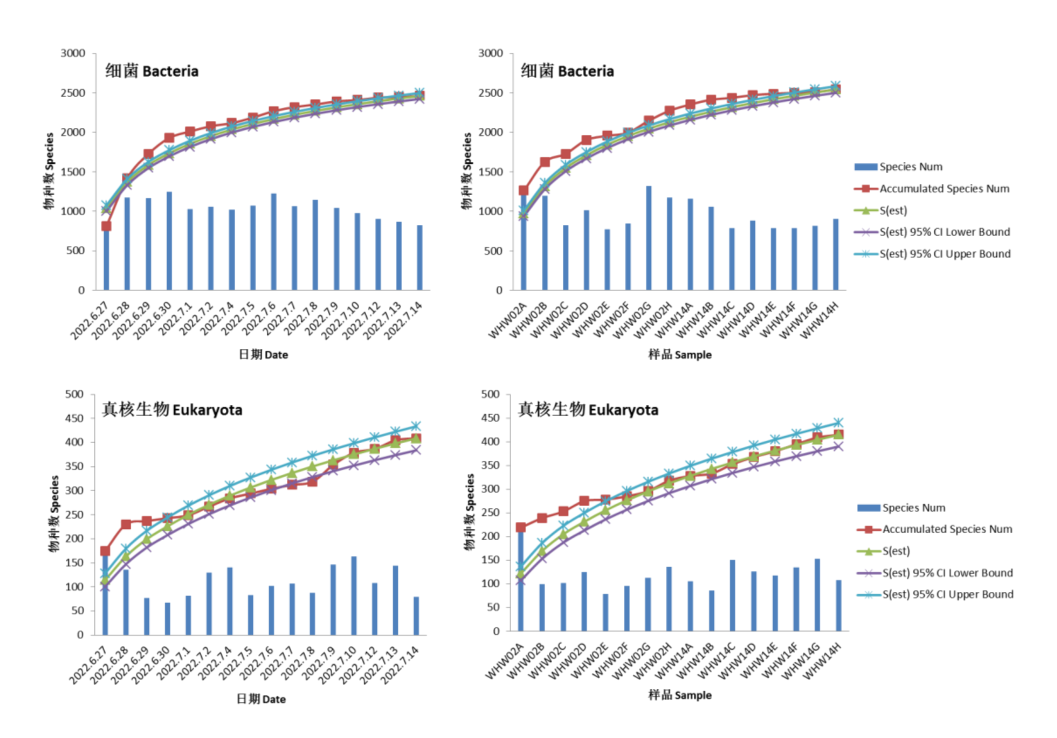


图 2 时间序列样品组和空间序列样品组检出的原核生物（细菌）和真核生物的物种数、逐样累计物种数、物种累计曲线

Figure 2 Species numbers, accumulated species numbers and rarefaction cure of the Prokaryota (Bacteria) and Eukaryota species that detected in the samples of temporal group and spatial group

表 2 时间序列样品组和空间序列样品组检出的物种数和物种组成异质性

Table 2 Species numbers and species composition heterogeneity of each taxonomy that detected in the samples of temporal group and spatial group

	时间序列样品组				空间序列样品组			
类群	累计物种数	自有物种数	检出物种数总占比	物种组成的异质性	累计物种数	自有物种数	检出物种数总占比	物种组成的异质性
原核生物	2461	276	87%	2.37	2543	358	90%	2.61
真核生物	409	98	80%	3.58	415	104	81%	3.40
真核-真菌	132	47	81%	7.06	115	30	71%	5.75
真核-藻类	105	16	85%	2.14	107	18	87%	2.00
真核-原生动物	21	4	78%	4.42	23	6	85%	4.13
真核-后生动物	150	31	75%	3.67	169	50	85%	4.03
真核-后生-浮游生物	43	4	90%	2.60	44	5	92%	2.60
真核-后生-底栖生物	67	19	65%	3.91	84	36	82%	4.38
真核-后生-鱼类	34	8	92%	5.61	29	3	78%	6.63

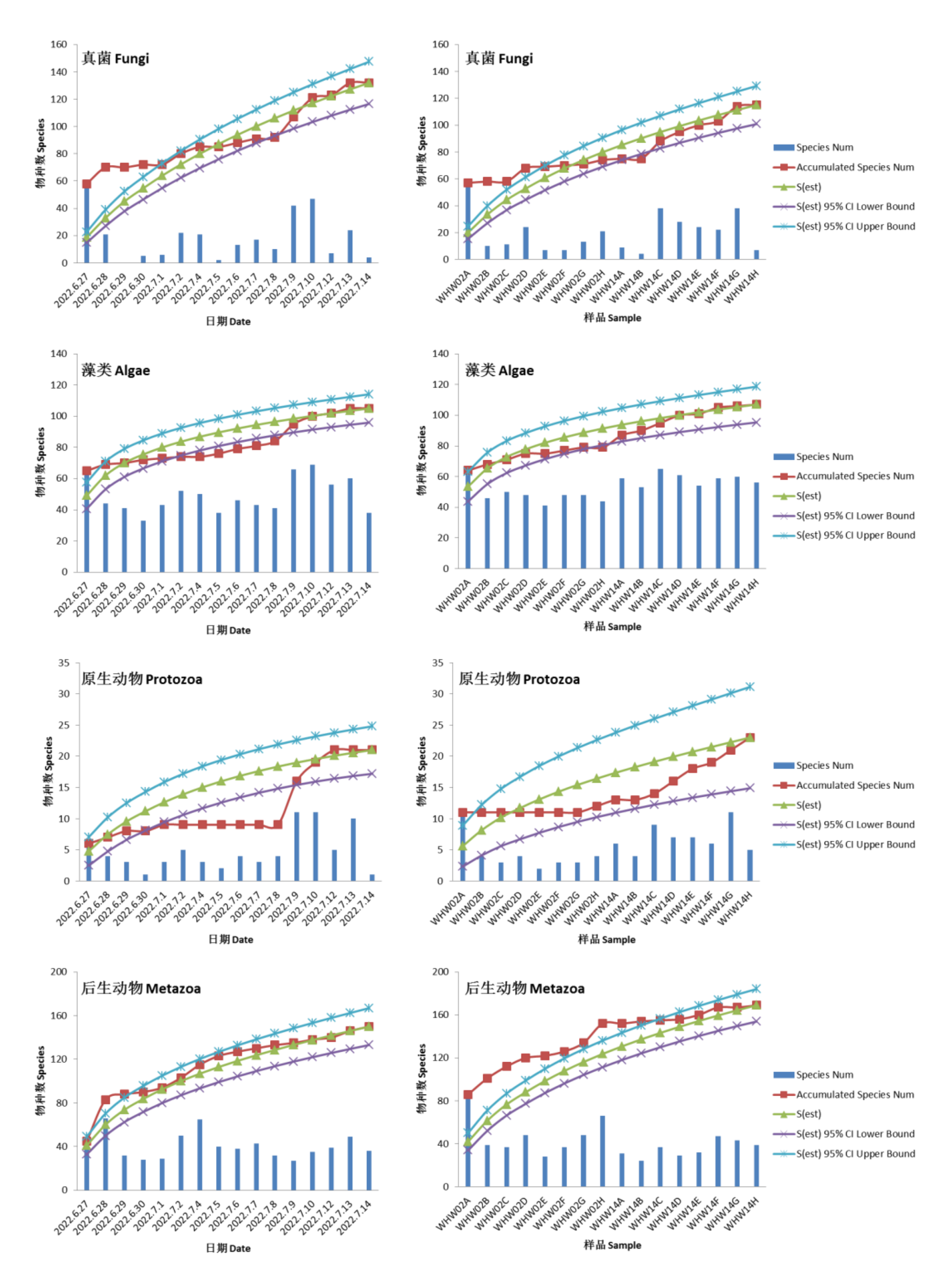
注：累计物种数，样品组内所有样品累计检出的物种数量；自有物种数，本样品组检出而另一个样品组未

chinaXiv:202307.00039v1

检出的物种数；检出物种数总占比，样品组的累计物种数除以两个样品组所有样品累计检出的物种数量；物种组成的异质性，样品组内单样品检出的物种数量除以样品组的累计物种数。

对真核生物进行大类群细分，真菌的物种检出数量在时间上、空间上均呈随机波动、无明显趋势且异质性明显，物种组成的时间异质性（7.06）比空间异质性（5.75）更强，累计物种检出数量时间重复采样的（132）比空间重复采样的（115）多；藻类的物种检出数量在时间上、空间上均呈随机波动、无明显趋势，物种组成的时间异质性（2.14）比空间异质性（2.00）略强，累计物种检出数量时间重复采样的（105）与空间重复采样的（107）近似；原生动物的物种检出数量在时间上、空间上均呈随机波动、无明显趋势且异质性明显，物种组成的时间异质性（4.42）比空间异质性（4.13）更强，累计物种检出数量时间重复采样的（21）与空间重复采样的（23）近似；后生动物的物种检出数量在时间上呈随机波动、无明显趋势，在空间上有近岸多、河中间少的微弱趋势，物种组成的时间异质性（3.67）比空间异质性（4.03）弱，累计物种检出数量时间重复采样的（150）比空间重复采样的（169）少（图 3，表 2）。

chinaXiv:202307.00039v1



chinaXiv:202307.00039v1

图 3 时间序列样品组和空间序列样品组检出的真核生物中真菌、藻类、原生动物、后生动物的物种数、逐样累计物种数、物种累计曲线

Figure 3 Species numbers, accumulated species numbers and rarefaction cure of the Fungi, Algae, Protozoa and Mezozoa species that detected in the samples of temporal group and spatial group

对后生动物进行小类群细分，浮游生物的物种检出数量在时间上、空间上均呈随机波动、无明显趋势，物种组成的时间异质性（2.60）和空间异质性（2.60）相近，累计物种检出数量时间重复采样的（43）比空间重复采样的（44）略少；底栖生物的物种检出数量在呈随机波动、无明显趋势，在空间上有近岸多、河中间少的微弱趋势，物种组成的时间异质性（3.91）比空间异质性（4.38）弱，累计物种检出数量时间重复采样的（67）比空间重复采样的（84）少；鱼类的物种检出数量在时间上呈随机波动、无明显趋势，在空间上有近岸多、河中间少的微弱趋势，物种组成的时间异质性（5.61）比空间异质性（6.63）弱，累计物种检出数量时间重复采样的（34）比空间重复采样的（29）多（图 4，表 2）。

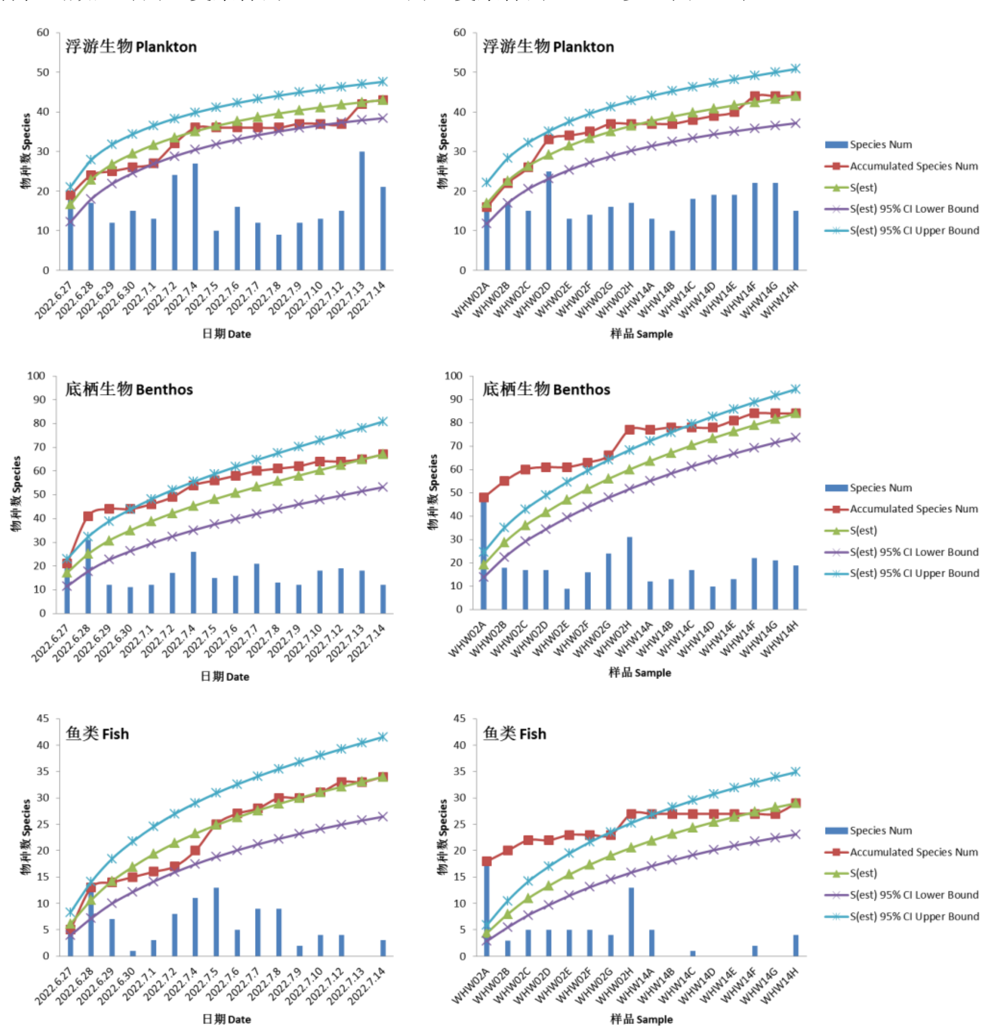


图 4 时间序列样品组和空间序列样品组检出的后生动物中浮游生物、底栖生物、鱼类的物种数、逐样累计物种数、物种累计曲线

Figure 4 Species numbers, accumulated species numbers and rarefaction cure of the Plankton, Benthos and Fish species (Mezozoa) that detected in the samples of temporal group and spatial group

chinaXiv:202307.00039v1

chinaXiv:202307.00039v1

3 讨论

空间序列样品比时间序列样品所检出的累计物种数多（真菌和鱼类例外），所检出物种组成的空间异质性比时间异质性大（真菌、藻类、原生动物例外）。在大型河流中，水体在较短的径流距离内难以完成水流的充分混合，受岸带土壤微生物输入的影响[17, 18]，近岸水体中可检出的细菌种类数会比河流中间的略多（图 2）。由于细菌在流域生物信息流中生命体信息（活的或休眠的细菌个体）占比较高，且非生命体信息（死的或破碎的细菌细胞）输移半衰距离较长[17-19]，eDNA 检出的细菌物种组成的时间异质性比空间异质性略小（表 2）。水体中的真菌、藻类（浮游植物）、原生动物（浮游动物）是水体中原生的生物类群，且在水体小尺度空间中存在相对一致的物种及群落组成，尽管在流域生物信息流中生命体信息（活的或休眠的个体）占比较高，非生命体信息（死的个体或破碎的细胞）输移半衰距离较长，时间序列样品中检出的累计物种数也比空间序列样品中检出的略多或近似，eDNA 检出的物种组成的时间异质性也比空间异质性略大（表 2）。后生动物（比如底栖生物、鱼类）虽然也是水体中原生的生物类群，但在大型水体中，存在较为明显的分布及活动空间差异，且在流域生物信息流中生命体信息(活的或休眠的个体)占比较低，非生命体信息（死的个体或破碎的细胞）输移半衰距离较短，因而时间序列样品中检出的累计物种数也比空间序列样品中检出的少，eDNA 检出的物种组成的时间异质性也比空间异质性小（表 2）。比如鱼类和底栖生物倾向于在近岸浅水区生活和活动，在近岸水域持续释放 eDNA，因而在近岸水体中可检出的鱼类和底栖生物种类数会比河流中间的略微要多（这一点与湖泊这种具有大水面的水体类似[20, 21]），eDNA 检出的物种组成的空间异质性比时间异质性要大（表 2）。因此，**在大型河流中，用 eDNA 监测环境微生物和真核生物中的后生动物，样品重复的设计建议优先关注空间重复采样；监测真核生物中的真菌、藻类、原生动物，样品重复的设计建议优先关注时间重复采样**。

eDNA 监测的目标类群越细分，监测中偶然性误差的影响越大，检出的物种组成的时间异质性、空间异质性越大。因为 eDNA 在水体中并非均匀分布，所以不同样品间检出的 eDNA 信号存在一定的差异。eDNA 监测目标类群越细分，这些差异信号落入同一个目标类群的概率越低，进而导致检出的物种组成的时间异质性、空间异质性越大，虽然存在一定的类群特异性（表 2）。本研究中，第一层级（原核生物、真核生物）的时间异质性、空间异质性整体比第二层级（真核生物中的真菌、藻类、原生动物、后生动物）的低，比第三层级（真核生物中的后生动物中的浮游生物、底栖生物、鱼类）的低，其中真核生物中的藻类是第二层级中的特殊类群，真核生物中的后生动物中的浮游生物是第三层级中的特殊类群，其时间异质性、空间异质性均比其上一级的要低(表 2)。因而**在针对于细分类群的 eDNA 监测中，要保证足够的样品重复数**。

eDNA 监测的各目标类群的时间异质性和空间异质性有其一定的规律，虽然不一定十分严格准确，仍值得在实践中予以考虑。需要优先关注空间重复采样的监测目标类群——原核生物（细菌），因为存在岸带土壤微生物的输入[17, 18]，所以在降雨天有岸带泥沙冲入河道的时候与在无雨天河水清澈的时候，所能检出的物种数、物种组成都是有比较大的差异，因而在监测中可根据目标需求选择监测采样时间和天气条件。需要优先关注空间重复采样的监测目标类群——鱼类，在涨水时期鱼类向近岸浅水区扩散且在水体中上层活动活跃，在落水时期向江心深水区聚集且倾向于在水体中下层活动，因而在涨水期近岸和中上层水的 eDNA 监测检出鱼类种类数会整体性比落水期检出的鱼类种类数要多（表 1，图 4），因而在监测中应尽可能选择涨水期开展采样工作。另外，依靠生物个体体外 eDNA 而非生物个体或有细胞壁包裹的胞内 eDNA 进行物种检出的目标类群，温度升高往往会对其产生负面影响（比如鱼类，表 1，图 4），在监测工作和结果评估中也应予以相应考虑。需要优先关注时间重复采样的监测目标类群——真核生物中的真菌、藻类、原生动物，往往在河道弯曲、水流速较低的河段有相对丰富的群落组成和生物量，在河道顺直、水流速较高的河段有相对贫乏的群落组成和生物量，因而在监测中可根据目标需求选择监测采样点位。

chinaXiv:202307.00039v1

参考文献

[1] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, *et al.*. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. 2012, **21**(8): 1789-1793. 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x

[2] Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, *et al.*. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*. 2014, **29**(6): 358-367. 10.1016/j.tree.2014.04.003

[3] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*. 2020, **29**(22): 4258-4264. https://doi.org/10.1111/mec.15643

[4] Yang HL, Zhang H, Du H. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. *Journal of Lake Sciences*. 2023, **35**(1): 12-31. 10.18307/2023.0100[杨海乐，张辉，杜浩. eDNA监测方法标准化框架及未来图景. *湖泊科学*. 2023, **35**(1): 12-31. 10.18307/2023.0100]

[5] Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*. 2015, **183**(SI): 4-18. 10.1016/j.biocon.2014.11.019

[6] Coble AA, Flinders CA, Homyack JA, *et al.*. eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of the Total Environment*. 2019, **649**: 1157-1170. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.370

[7] Larson ER, Graham BM, Achury R, *et al.*. From eDNA to citizen science: emerging tools for the early detection of invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2020, **18**(4): 194-202. 10.1002/fee.2162

[8] Yao M, Zhang S, Lu Q, *et al.*. Fishing for fish environmental DNA: Ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward. *Molecular Ecology*. 2022, **31**(20): 5132-5164. 10.1111/mec.16659

[9] Deiner K, Yamanaka H, Bernatchez L. The future of biodiversity monitoring and conservation utilizing environmental DNA. *Environmental DNA*. 2021, **3**(3): 3-7. https://doi.org/10.1002/edn3.178

[10] Leese F, Bouchez A, Abarenkov K, *et al.*. Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. *Advances in Ecological Research*, In: Bohan D A, Dumbrell A J, Woodward G, *et al.* eds., 2018: 63-99.

[11] Nicholson A, Mcisaac D, Macdonald C, *et al.*. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. *Environmental DNA*. 2020, **2**(3): 343-349. 10.1002/edn3.81

[12] Loeza-Quintana T, Abbott CL, Heath DD, *et al.*. Pathway to Increase Standards and Competency of eDNA Surveys (PISCeS)—Advancing collaboration and standardization efforts in the field of eDNA. *Environmental DNA*. 2020, **2**(3): 255-260. https://doi.org/10.1002/edn3.112

[13] Minamoto T, Miya M, Sado T, *et al.*. An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*. 2021, **3**(1): 8-13. https://doi.org/10.1002/edn3.121

[14] 中国环境科学学会. 关于征求《水生生物DNA条形码构建规程（征求意见稿）》等3项团体标准意见的函 2023.2.18. http://www.chinacses.org/xw/gsgg/202205/t20220516_982140.shtml.

[15] Yang HL, Yang JL, Fang DD, *et al.*. Suggestions on the technical details of monitoring fish community in Yangtze River after fishing-ban. *Journal of Fisheries of China*. 2023, **47**(2): 219-232.[杨海乐，杨俊琳，方冬冬等. 禁捕后长江鱼类资源监测的技术指标建议. *水产学报*. 2023, **47**(2): 219-232.]

[16] Yang HL, Wu JM, Zhang H, *et al.*. Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*. 2021, **28**(6): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556[杨海乐，吴金明，张辉等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率:以长江武汉江段为例. *中国水产科学*. 2021, **28**(6): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556]

[17] Yang HL, Du H, Qi HF, *et al.*. Watershed biological information flow driven by natural runoff in Shaliu River Basin on Qinghai-Tibet Plateau indicated by environmental microbes. *Acta Ecologica Sinica*. 2021, **41**(9): 3475-3487. 10.5846/stxb202001010001[杨海乐，杜浩，祁洪芳等. 青藏高原沙柳河流域自然径流驱动的流域生物信息流量化特征——以环境微生物为指标. *生态学报*. 2021, **41**(9): 3475-3487. 10.5846/stxb202001010001]

[18] Yang HL, Du H, Qi HF, *et al.*. Effectiveness assessment of using riverine water eDNA to simultaneously monitor the riverine and riparian biodiversity information. *Scientific Reports*. 2021, **11**(1): 24241. 10.1038/s41598-021-03733-7

[19] Yang HL, Xu LX, Zhou Q, *et al.*. Quantifying the spatial resolution of eDNA monitoring: a case study in Middle Yangtze River in mean-flow period. *ChinaXiv*. 2023(202303): 8735. 10.12074/202303.08735V1[杨海乐，许兰馨，周琼等. eDNA监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例. *ChinaXiv*. 2023(202303): 8735. 10.12074/202303.08735V1]

[20] Zhang S, Lu Q, Wang Y, *et al.*. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*. 2020, **20**(1): 242-255. 10.1111/1755-0998.13105

[21] Picard MHV, Zaiko A, Tidy AM, *et al.*. Optimal sample type and number vary in small shallow lakes when targeting non-native fish environmental DNA. *Peerj*. 2023, **11**.

chinaXiv:202307.00039v1